Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. W. Schmid

Versuche über die Nitro-Reduktion am Chloramphenicolmolekül durch die Rattenleber

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Peter Siebold

aus Ziegenhain

Marburg 1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. W. Schmid

Versuche über die Nitro-Reduktion am Chloramphenicolmolekül durch die Rattenleber

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Peter Siebold

aus Ziegenhain

Marburg 1968

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg am 29. 2. 1968

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr.med. R. Siegert

Referent: Prof. Dr.med. W. Schmid

Correferent: Prof. Dr.med. G.W. Löhr

INHALT

	Seite
A. EINLEITUNG	5
B. VERSUCHSMETHODEN	7
1. Gewinnung und Verarbeitung von Rattenharn	7
2. Verarbeitung von Menschenharn	7
3. Inkubation in der Warburg'schen Apparatur	7
a) unter O_2-Begasung	7
b) unter N_2-Begasung	8
4. Gewinnung und Inkubation von Mikrosomen	9
5. Dünnschichtchromatographie	10
6. Nachweis getrennter Substanzen unter UV-Licht und colorimetrische Darstellung funktioneller Gruppen	10
a) Betrachtung unter UV-Licht	10
b) Darstellung aromatischer NO_2-Gruppen	11
c) Darstellung aromatischer NH_2-Gruppen	11
d) Nachweis von Glucuroniden mit Anilinphthalat	11
e) Darstellung aromatischer Amino- und aromatischer Nitrosogruppen in vitro in analoger Weise zur Methode nach Kiese und Herr	12
f) Darstellung aromatischer Amino- und aromatischer Nitrosogruppen mit Fearrons Reagenz	12
7. Säulenchromatographie und Sammeln mit dem Fraktionssammler	13
8. Nachweis von Chlorid in eluierten Kieselgelfraktionen	13
9. Acetylierung von aromatischen Aminen	14

C. VERSUCHSERGEBNISSE 15

1. Isolierung von Chloramphenicolabbauprodukten aus Rattenharn 15

2. Isolierung von Chloramphenicolabbauprodukten aus Menschenharn 16

3. Vergleich der Rf-Werte der aus Menschen- und Rattenharn isolierten Verbindungen 16

4. Säulenchromatographische Sammlung der dünn= schichtchromatographisch gefundenen Chlor= amphenicolabbauprodukte aus dem Menschenharn 17

5. Ergebnis der Mikrosomeninkubation 17

6. Isolierung von Chloramphenicolabbauprodukten durch Inkubation mit Schnitten von Rattenleber 18

a) unter O_2-Begasung 18

b) unter N_2-Begasung 20

7. Vergleich der Rf-Werte der im Rattenharn (C1) und der durch Inkubation unter O_2-Begasung gefundenen Verbindungen 22

8. Vergleich der durch Inkubation bei O_2- und N_2-Begasung gefundenen Chloramphenicolabbau= produkte 24

D. DISKUSSION 24

E. ZUSAMMENFASSUNG 26

F. LITERATURVERZEICHNIS 27

A. EINLEITUNG

Das Antibioticum Chloramphenicol fällt durch seine beson= dere chemische Konstitution auf. Es enthält die für ein Natur= produkt außerordentlich seltene Nitrogruppe; und auch das Vor= handensein der Dichloressigsäure ist ungewöhnlich.

Obwohl aromatische Nitroverbindungen wegen ihrer Met- haemoglobin-bildung durch eine hohe akute Giftigkeit gekenn= zeichnet sind und außerdem bei chronischer Anwendung eine Schädigung des hämatopoetischen Systems zur Folge haben, be= sitzt Chloramphenicol im Vergleich dazu eine außerordentlich große therapeutische Breite.

Immerhin ist auch beim Chloramphenicol das Bild der Agranu= locytose relativ häufig anzutreffen. Ob man diese mit der Ni= trophenylgruppe in Zusammenhang bringen darf, ist fraglich.

Eine Besonderheit finden wir beim Neugeborenen (Lit.14). Hier kommt es bei zu hoher Dosierung in einem großen Prozent= satz zu einer tödlichen Vergiftung. Diese wird darauf zurück= geführt, daß wegen der geringen Aktivität der Glucuronidtrans= ferase das Chloramphenicol nicht gekoppelt und damit auch nicht entgiftet werden kann.

Weiterhin sind bei Säuglingen und Kleinkindern Vergiftungs= fälle bekannt, bei denen therapeutische Chloramphenicoldosen zusammen mit anderen Medikamenten gegeben worden waren (Lit. 16). Wenn diese Fälle im einzelnen auch nicht geklärt werden konnten, so kann doch vermutet werden, daß hier eine in den letzten Jahren mehrfach beobachtete Wirkung des Chloramphenicols eine Rolle spielt, nämlich die Hemmung mikrosomaler Umbauvorgänge in der Leber (Lit.19). Diese Wirkung ist zum mindesten beim Tier vorhanden. Vorausgegangene Untersuchungen von KRUG und JEHN hatten nämlich ergeben, daß der Abbau von Hexobarbital schon durch Dosen gehemmt wird, die - auf den Menschen bezogen - im therapeutischen Bereich liegen (Lit.18). So lag die unterste Dosis bei der Maus bei 5 mg/kg. In parallel laufenden Versuchen war für das Ganztier gezeigt worden, daß die Beeinflussung der Lebermikrosomen nur durch das Ge=

samtmolekül hervorgerufen wird und daß auf jeden Fall die Entfernung der Dichloressigsäure den Effekt aufhebt.

Chloramphenicol wird in der Leber zum großten Teil an Glucuronsäure gekoppelt - wobei die Nitrogruppe intakt bleibt - und entgiftet. Ein gewisser Anteil, der von Tierart zu Tierart schwankt, wird zur Aminogruppe reduziert (Lit,1,7). Es ist nun zu vermuten, daß gerade bei der Reduktion des Chloramphenicols wirksame Zwischenstufen wie etwa Nitroso- oder Hydroxylaminverbindungen verantwortlich für die Hemmung mikrosomaler Fermente sind, möglicherweise in Analogie zum Abbau des Anilins. Bei diesem entstehen als Oxydationsstufen das Nitrosobenzol bzw. Hydroxylamin und führen in einem Kreisprozeß die Met-Hb-Bildung in den Erythrozyten herbei (Lit.13). Versuche am Ganztier haben allerdings keine Beweise für den Kreisprozeß erbracht; immerhin wurde das Nitrosobenzol gefunden (Lit. 11,12). Außerdem konnte bei der Reduktion des Nitrobenzols neben Nitrosobenzol eine Aminoverbindung nachgewiesen werden (Lit.10,11).

Um eindeutige Verhältnisse zu schaffen, wurden in der vorliegenden Arbeit Leberschnitte von Ratten verwendet. An ihnen wurde die Möglichkeit eines reduktiven Abbaus des Chloramphenicols unter verschiedenen Versuchsbedingungen geprüft.

B. VERSUCHSMETHODEN UND BEGRÜNDUNG IHRER ANWENDUNG

1. Gewinnung und Verarbeitung von Rattenharn

Weiblichen Ratten mit einem Gewicht von ca. 160 g wurde intramusculär (Nackenfalte) eine Dosis von 25 mg, entsprechend 150 mg/kg Chloramphenicolsuccinat*) injiziert. Anschließend wurde der Harn 24 Stunden in einem Trichter gesammelt, mit 15 ml Essigester ausgeschüttelt und bei Raumtemperatur im Rotationsverdampfer Büchi zu etwa 2 ml eingeengt.

2. Verarbeitung von Menschenharn

Menschenharn von Patienten, die sich wegen eines Infektes der ableitenden Harnwege einer Chloramphenicoltherapie unterziehen mußten, wurde bei 20° - 30°C im Rotationsverdampfer bis zur Trübung konzentriert und bei 2700 U./min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit der gleichen Menge Essigester ausgeschüttelt und bei 20° - 30°C im Rotationsverdampfer zu wenigen ml eingeengt.

3. Inkubation in der Warburg'schen Apparatur

a) unter O_2-Begasung

Weibliche Albinoratten mit einem Gewicht von ca. 160 g wurden durch Genickschlag getötet, innerhalb von 30 - 60 sec wurde die Leber herauspräpariert und in 0°C vorgekühlte Tyrode gelegt. Dann wurde die Leber möglichst rasch in etwa 200 µ dicke Scheiben geschnitten und jeweils 500 mg in eine vorbereitetes Inkubationsgefäß gebracht, das ebenfalls in Eiswasser vorgekühlt war.

Ein Inkubationsgefäß enthielt als "Vollwert":

7,5 ml Phosphat-Tyrode pH 7,4 gepuffert,
500 mg Leberschnitte,
1000 γ Chloramphenicolsuccinat,

*) Chloramphenicol wurde uns als Leukomycin^R freundlicherweise von der Firma Bayer zur Verfügung gestellt.

Gleichzeitig wurden Inkubationsgefäße als Leerwerte vorbereitet:

7,5 ml Phosphat-Tyrode pH 7,4 gepuffert
1000 γ Chloramphenicolsuccinat

und

7,5 ml Phosphat-Tyrode pH 7,4 gepuffert
500 mg Leberschnitten.

Die Menge von 1000 γ Chloramphenicol für 500mg Leberschnitten wurde aus folgenden Überlegungen gewählt: Beim Menschen mit etwa 5000 ml Blut und 1500 g Lebergewicht beträgt die therapeutische Dosis 1,0 - 2,0 g Chloramphenicol/Tag. Eine Ratte von 160 g hat etwa 32 ml Blut und eine 7 g schwere Leber. Umgerechnet entspräche also die therapeutische Dosis bei der Ratte 6,5 mg Chloramphenicol/Tag. Umgerechnet auf 500 mg Leberschnitte sind das 930 γ - 1860 γ Chloramphenicol. Als optimal erwies sich 1000 γ Chloramphenicol/500 mg Leberschnitte.

Der Ansatz wurde bei 37°C mit einer O_2-CO_2 (95%-5%)-Begasung geschüttelt. Die O_2-CO_2-Begasung wählten wir deshalb, weil hierbei ein Eindringen des O_2 in die Leberschnitten bis beiderseits 200 µ gewährleistet ist, während bei dem Partialdruck der Luft der Sauerstoff nur 50 µ beiderseits eindringt (Lit.24).

Nach 30 min wurde die Inkubation gestoppt und der Inhalt der Gefäße sofort mit jeweils 20 ml Essigsäureäthylester 3 x ausgeschüttelt. Nach jedem Ausschütteln wurden die Phasen bei 2700 U/min zentrifugiert und der Essigesterüberstand abgehoben. Die so erhaltene Essigesterphase wurde dann bei Raumtemperatur im Rotationsverdampfer zu etwa 2 ml eingeengt und mittels Kapillaren auf DC-Platten aufgetragen (s.u.

b) unter N_2-Begasung

WESTFALL (Lit.20) berichtet, daß Trinitrotoluol durch Kaninchenleber in vitro umgesetzt wird und hierbei eine diazotierbare Substanz auftritt; dieser Reduktionsvorgang verläuft anaerob schneller und sicherer als bei Luftzufuhr.

Auch HONDA und OTSUKA (Lit.9) maßen die Reduktion von p-Nitrophenol in Leberhomogenaten von Ratten, wobei sie fanden,

daß die Reduktion anaerob höhere Ausbeuten ergab als unter aeroben Versuchsbedingungen.

Schließlich konnten HAAN, KIESE und WERNER (Lit.10) in vitro Nitrosobenzol über Phenyhydroxylamin zu Anilin reduzieren. Auch diese Reaktion verlief anaerob sehr viel schneller als bei Anwesenheit von O_2. Dabei zeigte sich auch, daß die Reduktion zu Anilin unter N_2-Begasung auch bei Anwesenheit kleiner Mengen Sauerstoff nur wenig beeinflußt wurde, unter CO_2-Begasung jedoch verzögert verlief.

Wir inkubierten deshalb in einer weiteren Versuchsreihe wieder wie oben beschrieben, doch wurde diesmal die Sauerstoffzufuhr durch eine N_2-Begasung ersetzt.

Die Inkubationszeiten betrugen: 2, 5, 7, 10, 20, 30, 60 Minuten (Lit.13), anschließend wurden die Versuche durch sofortiges Ausschütteln mit 10 ml Essigester gestoppt.

4. Gewinnung und Inkubation von Mikrosomen aus Rattenleber

Die Präparation wurde bei 0°C ausgeführt, um die Leberzellstrukturen zu erhalten.

5 weibliche Ratten wurden durch Genickschlag getöet, die Leber sofort herauspräpariert und homogenisiert. Dabei wurden 6 g Leber und 30 ml Sacharoselösung 0,25 molar in einem Teflonpotter zerkleinert. Aus dem so gewonnenen Homogenat wurden die Mikrosomen, wie aus folgendem Schema ersichtlich, abzentrifugiert.

Homogenat
10 min bei 600 g = 2300 U./min
zentrifugiert (Christzentrifuge)

Niederschlag:	Überstand:
Kerne	20 min bei 10000 g = 10 000 U./min
Niederschlag:	Überstand:
Mitochondrien	60 min bei 100 000 g = 30 000 U./min
Niederschlag:	Überstand:
Mikrosomen	Plasma

Die gesamte erhaltene Mikrosomenfraktion wurde bei 37°C mit Chloramphenicol inkubiert, ausgeschüttelt, eingeengt (Methode B3a) und auf DC-Platten (s. unter 5.) aufgetragen.

5. Dünnschichtchromatographie

Die bisher verwandten Papierchromatographiemethoden sind relativ aufwendig und beanspruchen viel Zeit. Der Vorteil der Dünnschichtchromatographie liegt in der einfachen Versuchsanordnung, in der kurzen Trennzeit und dem guten Trenneffekt (Lit.22).

In unseren Versuchen wurden die zu trennenden Substanzen auf 20 x 20 cm Platten in aufsteigender Methode entwickelt.

Sorptionsmittel war Kieselgel GF_{254} der Firma Merck mit einer Schichtdicke von 0,25 mm. Die Desaga-Trennkammer (21 x 21 x 9) schloß luftdicht. Die Kammersättigung wurde erhalten durch Auskleidung der Kammer mit Filtrierpapier, das mit dem Fließmittel befeuchtet wurde. Ein methodisch langwieriges Problem ergab sich bei der Suche nach einem geeigneten Fließmittel, um einen guten Trenneffekt der noch nicht identifizierten Substanzen zu erzielen. Erprobt wurden die auf Seite 29, 30 und 31 aufgeführten Fließmittel. Als bestes erwies sich dabei eine Mischung aus Chloroform 6 / Isobutanol 20 / Isopropanol 20 / Methanol 2,0, wobei eine exakte Trennung der in der Essigesterphase gelösten Chloramphenicolmetaboliten erzielt wurde. Die Laufstrecke betrug 10 bzw. 15 cm.

6. Nachweis getrennter Substanzen unter UV-Licht und colorimetrische Darstellung funktioneller Gruppen

a) Betrachtung unter UV-Licht

Die entwickelten Platten wurden zuerst bei UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm betrachtet. Die auf der Kieselgel GF_{254}-Platte vorhandenen Substanzen stellten sich dabei infolge Lichtabsorption als dunkle Flecken dar. Durch Vergleich der Vollwerte mit den Leerwerten konnte der Rf-Wert von Abbauprodukten des Chloramphenicols ermittelt werden.

Die Betrachtung der Platten unter UV-Licht und das Auftre-

ten von Flecken ist jedoch kein absoluter Beweis für die Lage aller Verbindungen, die sich auf der Platte befinden. Die Mehrzahl der Substanzen stellt sich zwar durch Lichtabsorption dar, so daß die Fließmittelfront und der genaue Weg der gelaufenen Substanzen bestimmt oder bestätigt werden kann. Anschließend mußte aber noch die colorimetrische Darstellung einzelner funktioneller Gruppen durch Bildung gefärbter Derivate folgen.

b) Darstellung aromatischer NO_2-Gruppen und ihrer Reduktionsprodukte

Die Anwesenheit und die Lage der Nitroverbindungen auf der Platte wird durch Bildung gefärbter Derivate gezeigt (Lit.3):

Zur Reduktion der Nitrogruppen wird mit einem feinen Zerstäuber ein 15%iges Titanchloridreagenz verdünnt mit einer 1N-HCl-Lösung im Verhältnis 1:10 auf die Platte gesprüht. Noch feucht wird die Platte in einem Glasgefäß Bromdämpfen ausgesetzt, die das überschüssige Titanchlorid oxydieren und somit der nachfolgenden Reaktion entziehen. Die Behandlung mit Brom scheint auf die reduzierten Verbindungen direkt einzuwirken. So ist die karminrote Farbe, die nach dieser Behandlung auftritt, eine ganz andere als die Amethystfärbung nach der Behandlung ohne Bromierung. Die Platte wird dann in einem Abzug gelüftet, um das überschüssige Brom zu entfernen.

Die inzwischen getrocknete Platte wird mit einer Mischung von 10 Teilen Butylnitrit, 5 Teilen n-Butanol und einem Teil Eisessig besprüht. Nach weiteren 2 Minuten wird die Platte mit einer Lösung von 0,1 % N-(1-naphthyl)äthylendiamindihydrochlorid in 95 ml n-Butanol und 5 ml 2 N-HCl besprüht. Eine Rosafärbung zeigt die Anwesenheit von aromatischen NO_2-NH_2-Gruppen an.

c) Die Anwesenheit aromatischer Amine wird direkt nachgewiesen durch Bepsrühen der entwickelten Platte mit Butylnitrit und Kupplungsreagenz, wobei jedoch jetzt Reduktion und Bromierung ausgelassen werden.

d) Nachweis von Glucuroniden mit Anilinphthalat

Da zu erwarten ist, daß in der Leber Chloramphenicol durch

Kupplung mit Glucuronsäure entgiftet wird, versuchten wir diese Glucuronide mit Anilinphthalt nachzuweisen. Dabei wurden die Platten mit Anilinphthalat besprüht, 15 min bei 105°C im Trockenschrank gehalten und anschließend unter UV-Licht betrachtet.

Bei Anwesenheit von Uronsäure gibt der Fleck eine jeweils charakteristische Fluoreszenz.

e) Darstellung aromatischer Amino- und aromatischer Nitrosogruppen in vitro in analoger Weise zur Methode nach KIESE und HERR (Lit.11)

Die Inkubationsversuche (B3) wurden nach 2, 5, 7, 10, 20, 30 min unterbrochen, sodann wurde
die Inkubationsmischung mit 6 ml Tetrachlorkohlenstoff 10 min auf der Schüttelbank geschüttelt,
10 min lang bei 5000 U./min zentrifugiert,
die H_2O-Phase abgehoben,
der Tetrachlorkohlenstoff mit 2 ml Eisessig und 0,1 ml 20%iger Natriumnitritlösung versetzt und im Verlauf von 15 min 3 mal kräftig durchgeschüttelt,
die überschüssige salpetrige Säure mit 0,2 ml 50%iger Ammoniumsulfamatlösung zersetzt und die Ansätze mehrmals kräftig durchgeschüttelt,
10 min stehen gelassen,
3 Tropfen 0,5%ige N-Naphthylaethylendiammoniumdichloridlösung zugesetzt, kurz durchgeschüttelt und der Extrakt 2 Stunden im Dunkeln gehalten.

Der Azofarbstoff befand sich in dem von Tetrachlorkohlenstoff getrennten Gemisch von Eisessig und Wasser.

f) Darstellung aromatischer Amino- und aromatischer Nitrosogruppen mit Fearrons Reagenz

S. OTSUKA (Lit.15) war es gelungen, nach der Methode von F. FEIGL (Lit.23) einen colorimetrischen Nachweis von Nitrosobenzol mit Fearrons Reagenz zu erbringen. Nitrosobenzol war in diesen Versuchen das Abbauprodukt des Nitrobenzols durch Schweineleberhomogenat. Entsprechend besprühten wir die im

Fließmittel gelaufenen und im Vakuum getrocknete Platte mit einer Lösung von
15 ml Fearrons Reagenz
5 ml 20%iger NaOH
1 Tropfen 30%igem Perhydrol.

7. Säulenchromatographie und Sammeln mit dem Fraktionssammler

Die Methode der Säulenchromatographie gestattet es, größere Substanzmengen zu trennen.

Wir verwendeten dabei eine Säule von 50 cm Länge und einem Durchmesser von 2,5 cm. Als Sorptionsmittel benutzten wir Kieselgel der Firma Merck mit einer Korngröße von 0,08 - 0,2 mm. Die Säule wurde mit dem Kieselgel, das in dem Fließmittel Chloroform 60 / Isobutanol 20 / Isopropanol 20 / Methanol 2 aufgeschwemmt war, gefüllt.

Der im Verdampfer eingeengte Essigesterauszug wurde an das Kieselgel adsorbiert und dieses trockenpulvrig mit einer Schichtdicke von ca. 1 cm auf die Säule aufgetragen.

8. Nachweis von Chlorid in eluierten Kieselgelfraktionen

Der Nachweis von Chlorid aus der Dichloroacetogruppe in den getrennten Verbindungen wurde in vitro durch Niederschlag von Silberchlorid geführt (Lit.21). Dabei mußte ein Oxydationsmittel gefunden werden, dessen Oxydationspotential ausreichte, um aus Chloramphenicol bzw. den getrennten Verbindungen organisch gebundenes Chlor in Chlorid zu überführen, das hingegen nicht Silberionen zu metallischem Silber oxydierte. Als optimal erwies sich Ammoniumperoxodisulfat.

So wurde
das Essigesterkonzentrat eines Inkubationsversuches (B3) dünnschicht-chromatographisch getrennt,
die unter UV-Licht lokalisierten Flecke der Chloramphenicolabbauprodukte von der Kieselgelplatte abgeschabt,
das Kieselgel in Chloramphenicol ausgeschüttelt,
dem Chloroformauszug 2 ml aqua dest. zugesetzt und das Chloroform im Umlaufverdampfer bei Zimmertemperatur abgedampft. Die

so gewonnene H_2O-Phase enthielt jetzt die Chloramphenicolab= bauprodukte und wurde
mit 1 ml Ammoniumperoxydisulfat und 2 Tropfen Silbernitrat versetzt.

Bei Anwesenheit von Chlorid fiel nach Stehen über Nacht ein weißer AgCl-Niederschlag aus, der sich mit NH_3 versetzt zu Silberdiammonium-Chlorid löste und unter dem Mikroskop charakteristische Tetraederform-Kristalle zeigte.

9. Acetylierung von aromatischen Aminen

Die Acetylierung der bis zum Amin reduzierten Chloramphe= nicolmetabolite erfolgte, um diese von der Diazotierung und anschließender Kupplung auszuschließen und zur Unterscheidung aromatischer Amine von noch vorhandenen paraständig reduzier= ten aromatischen Nitroverbindungen.
Dazu wurden
7,5 ml Pyridin,
2,5 ml Essigsäureanhydrid und das
Essigesterkonzentrat eines Inkubationsversuches
30 min bei 80°C im Wasserbad gehalten.

Anschließend wurde das Reaktionsgemisch bei 120°C Badetem= peratur im Vakuum auf 1 ml eingeengt und dünnschichtchromato= graphisch getrennt.

C. VERSUCHSERGEBNISSE

1. Isolierung von Chloramphenicolabbauprodukten aus Rattenharn

GLAZKO, DILL und WOLF (Lit.6) hatten bereits gefunden, daß bei kleineren Tieren wie Ratten und Meerschweinchen die aromatische Nitrogruppe des Chloramphenicols durch Gewebsenzyme zu aromatischen Aminen reduziert werden kann.

Uns interessierte, welche Chloramphenicolmetabolite nach intramuskulärer Injektion von Chloramphenicol im Harn von Ratten erscheinen und ob die in der Leber enzymatisch abgebauten Chloramphenicolderivate sich aus dem Harn dünnschichtchromatographisch isolieren lassen. So wurde das Essigesterkonzentrat des Harns von Ratten, denen Chloramphenicol injiziert worden war, dünnschichtchromatographisch entwickelt.

Dabei fanden wir regelmäßig (s. Abb. 1):

a) einen aromatischen Nitrokörper Rf-Wert 0,73, der durch Parallelchromatogramme als Chloramphenicol identifiziert wurde,
b) eine Verbindung mit einem Rf-Wert von 0,55,
c) eine Verbindung mit einem Rf-Wert von 0,36,
d) eine Verbindung mit einem Rf-Wert von 0,24.

Die Verbindungen b, c, d ließen sich colorimetrisch darstellen und die Anwesenheit aromatischer Nitrogruppen beweisen.

e) Regelmäßig bildeten sich vom Startpunkt bis zum Rf-Wert 0,18 ein Schwanz auf der Platte, der sich ebenfalls colorimetrisch darstellen ließ, in dem sich aber nur aromatische Nitroverbindungen befanden.

Als Kontrollwerte liefen Essigesterauszüge von Rattenharn ohne Chloramphenicolinjektion, bei denen keine aromatischen Nitrogruppen gefunden wurden.

Bei der Behandlung mit Anilinphthalat ließen sich aus den Essigesterauszügen des Rattenharns keine Uronsäureverbindungen darstellen.

2. Isolierung von Chloramphenicolabbauprodukten aus Menschenharn

Nach GLAZKO, DILL und WOLF und BRATTON (Lit.1,6) bestehen signifikante Unterschiede beim Chloramphenicolabbau kleiner Tiere wie Ratten und Meerschweinchen und dem Abbau des Chloramphenicols beim Menschen. Deshalb sammelten wir Menschenharn von Patienten, die sich einer Behandlung mit Chloramphenicol unterzogen hatten, verarbeiteten diesen (B2) und entwickelten die Abbauprodukte wie bei den obigen Versuchen. Außer Chloramphenicol erhielten die Patienten die Medikamente Nyxanthan ^{R}, Digitoxin ^{R} und Effortil ^{R}, die aber unseren Versuch nicht beeinflußten, da diese Präparate keine aromatischen NO_2- oder NH_2-Gruppen enthalten.

Dabei fanden wir regelmäßig (s. Abb. 1):

a) eine Verbindung Rf-Wert = 0,73, die durch Parallelchromatogramme als Chloramphenicol identifiziert wurde,
b) eine Verbindung mit einem Rf-Wert von 0,71,
c) eine Verbindung mit einem Rf-Wert von 0,36.

Die Verbindungen a, b und c enthalten aromatische NO_2-Gruppen.

d) Im Rf-Bereich vom Startpunkt bis 0,15 bildet sich ein Schwanz auf der Platte, in dem weitere NO_2-Verbindungen gelagert sind.

3. Vergleich der Rf-Werte der aus Menschen- und Rattenharn isolierten Verbindungen

Obwohl bedeutende Unterschiede beim Chloramphenicolabbau zwischen Menschen und Tieren bestehen, interessierte uns, ob die aus dem Menschen- und Rattenharn in Essigester ausgeschüttelten und isolierten Verbindungen identisch sind. Ein Vergleichschromatogramm mit Essigesterauszügen aus Menschen- und Rattenharn ergab, daß die Flecken a und c des Menschenharns den Flecken a und c des Rattenharns entsprachen (s. Abb. 1). Fleck b des Menschenharns konnte im Essigesterauszug des Rattenharns nicht wiedergefunden werden.

4. Säulenchromatographische Sammlung der dünnschichtchromatographisch gefundenen Abbauprodukte aus dem Menschenharn

Nach der dünnschichtchromatographischen Trennung von Chloramphenicolmetaboliten aus Menschenharn versuchten wir, durch Spektralanalyse eine weitere Strukturaufklärung der im Menschenharn isolierten NO_2-haltigen Chloramphenicoläquivalente zu erzielen. Da die dünnschichtchromatographisch getrennten Substanzen nur wenige γ betragen, zu einer Analyse jedoch eine Mindestmenge von ca. 50 mg notwendig ist, sammelten wir größere Mengen von Menschenharn. 4 l Harn eines Patienten, der 3 Tage lang 1 g Chl./Tag appliziert bekommen hatte, schüttelten wir mit Essigester aus und engten die Essigesterphase auf wenige ml ein (B2). Danach isolierten wir die im Essigesterauszug vorhandenen Substanzen durch die Säulenchromatographie (B7).

Durch dünnschichtchromatographische Rechromatographie der einzelnen Portionen des Fraktionssammlers konnten wir die Flecken a, b und c bestätigen (s. Abb. 2).

Außerdem fand sich vermutlich aufgrund der bedeutend längeren Laufstrecke und durch die erheblich größere Substanzmenge ein Fleck o mit einem Rf-Wert von 0,86, der ebenfalls ein nitrophenylhaltiges Chloramphenicolabbauprodukt enthalten mußte, wie colorimetrisch gezeigt werden konnte (B6$_{b,c}$).

Die dünnschichtchromatographisch als Schwanz erscheinenden NO_2-Körper ließen sich säulenchromatographisch in weitere Flecken d und e auftrennen, machten aber mengenmäßig nur einen kleinen Teil der gesamten Abbauprodukte aus.

Das säulenchromatographisch aus 4 l Menschenharn gewonnene Substrat wurde jetzt im Rotationsverdampfer rein dargestellt, indem wir das gesamte Fließmittel abdampften.

Das so erhaltene Reinsubstrat jedoch reichte mengenmäßig nicht aus, um eine Spektralanalyse durchführen zu lassen.

5. Ergebnis der Mikrosomeninkubation

Da der Chloramphenicolabbau bzw. die -entgiftung in den Leberzellmikrosomen stattfindet (Lit.19), inkubierten wir die

nach B4 gewonnenen Mikrosomen mit 1000 γ Chloramphenicol wie in B3 beschrieben.

Dünnschichtchromatographisch jedoch konnten wir eine Trennung mit dem erprobten Fließmittel Chloroform 60 / iso-Butanol 20 / iso-Propanol 20 / Methanol 2,0 nicht erzielen. Außerdem wanderten TPNH und Nicotinsäureamid als Fleckenkonglomerat in einem Rf-Bereich von 0,08 - 0,45 und hätten somit eine eventuell vorhandene Nitrosoverbindung vollständig überlagert.

Das unveränderte Chloramphenicol stellte sich bei diesem Versuch mit einem Rf-Wert von 0,73 deutlich dar (s. Abb. 3).

6. Isolierung von Chloramphenicolabbauprodukten durch Inkubation mit Schnitten von Rattenleber

a) unter O_2-Begasung

Bereits von SMITH und WORREL (Lit.8) wurden biochemische Studien über den Abbau von Chloramphenicol durch Mikroorganismen angestellt.

GLAZKO, DILL und WOLF (Lit.5,6), REBER und LICHTENBERG (Lit.7) gelang der papierchromatographische Nachweis von Abbauprodukten des Chloramphenicols in Ratten- und Menschenharn und die Identifikation der Abbauprodukte. Dabei wiesen sie darauf hin, daß Darmbakterien eine wesentliche Rolle bei der Chloramphenicolreduktion zukommt.

Uns interessierte, welche Rolle die Leber beim Chloramphenicolabbau und speziell der Reduktion aromatischer NO_2-Gruppen spielt, und wir versuchten, eventuelle Reduktionsprodukte dünnschichtchromatographisch darzustellen.

Wir inkubierten also Chloramphenicol nach der in B3a beschriebenen Methode. Dünnschichtchromatographisch konnten wir 3 Verbindungen isolieren, die durch enzymatischen Abbau des Chloramphenicols entstanden sein mußten.

Die Metabolite erschienen nur bei den Chloramphenicol-Leber-Werten (Chl.-L.), nicht bei den zur Kontrolle mitgelaufenen Leberwerten (L.) ohne Chloramphenicol.

Regelmäßig (s. Abb. 3 und 4)

a) fand sich ein Nitrokörper mit einem Rf-Wert = 0,73 (s. Harn). Durch Parallelchromatogramme, bei denen Chlor-

amphenicol als Vergleichswert lief, wurde diese Substanz als Chloramphenicol identifiziert,

b) wurde eine Verbindung mit dem Rf-Wert = 0,36 nachgewiesen, das Vorhandensein einer Nitrophenylgruppe wurde colorimetrisch bewiesen,

c) konnte eine Verbindung mit einem Rf-Wert von 0,27 unter UV-Licht und colorimetrisch dargestellt werden. Diese Verbindung muß eine aromatische Nitrosogruppe enthalten, wie sich nach $B6_{b,c,f}$ zeigen läßt:
Dieser Chloramphenicolmetabolit ließ sich zwar nach vorheriger Reduktion durch Behandlung mit Butylnitrit und Kupplungsreagenz karminrot darstellen,
eine Färbung ohne Reduktion bei alleiniger Kupplung gelang jedoch nicht.
Bei Besprühen mit Fearrons Reagenz erzielten wir den Versuchen OTSUKAs entsprechend eine die Nitrosogruppe beweisende Gelbfärbung.
Das Molekül enthielt kein Chlorid, wie der negative Ausfall der Chloridnachweisreaktion (B8) zeigte. Diese Tatsache und der niedrige Rf-Wert bei dem verwendeten System lassen vermuten, daß der Dichloressigsäurerest aus dem Molekül bereits hydrolytisch abgespalten ist.
Die zur dünnschichtchromatographischen Darstellung benötigte Auftropfmenge des Essigesterkonzentrates war hier wesentlich größer, als sie zur Darstellung von Fleck a genügte. In Parallelversuchen konnten noch 5 γ Chloramphenicol colorimetrisch dargestellt werden; man muß also folgern, daß bei der hier angewandten Inkubationsmethode der enzymatische Reduktionsvorgang nur in geringem Ausmaß stattfindet.

Zur Erhöhung der Abbaurate beim Chloramphenicol-Inkubationsversuch injizierten wir den Versuchstieren vor einem Versuch 7 Tage lang 25 mg Chl./die, da wir uns eine Aktivierung oder sogar die Zunahme der zum Abbau benötigten Reduktasen in der Ratenleber erhofften: gleichsam das "Erlernen" der Chloramphenicolreduktion durch die Mikrosomen. Die Verwendung so vorbehandelter Tiere ergab jedoch keine signifikante Abbauverbesserung.

Auch die Zugabe von TPNH und Nicotinsäureamid verbesserten das bisherige Versuchsergebnis nicht.

b) unter N_2-Begasung

Der qualitative Nachweis reduzierter Aminophenylgruppen in vitro mit der Methode nach KIESE und HERR (B6e) erlaubt eine Aussage, ob die Nitrophenylgruppe bei unserem Inkubationsversuch reduziert wurde. Durch eine sogenannte "kinetische Reihe", d.h. das Unterbrechen des Versuches nach verschieden langen Inkubationszeiten, erhielten wir eine Aussage darüber, nach welchen Inkubationszeiten ein Maximum an reduzierten Chloramphenicolmetaboliten vorlag.

Nach KIESE und HERR wird in den ersten Minuten des Kontakts eines Organismus mit Nitrophenol die größte Konzentration an Nitrosophenol und Aminophenol im Blute gemessen.

Bei einer solchen Versuchsreihe mit Leberschnitten unter N_2-Begasung konnten wir ein analoges Ergebnis nicht erzielen. Das Intensitätsmaximum des durch Verbindungen mit aromatischen NH_2-Gruppen gebildeten Azofarbstoffs wurde bei uns nach 20 Minuten erreicht. Eine kürzere oder längere Inkubationszeit dagegen zeigte keine Intensitätszunahme des von aromatischen NH_2-Gruppen mit Kupplungsreagenz gebildeten Azofarbstoffs, da offensichtlich die Reduktionskraft der vorhandenen Nitroreduktasen beschränkt ist und sich ein Gleichgewicht zwischen aromatischen NO_2-, NO- und NH_2-Verbindungen eingestellt hatte.

Bei der Inkubation unter N_2-Begasung, die ein annähernd O_2-freies Milieu gewährte, ließen sich dünnschichtchromatographisch folgende Verbindungen trennen, die am aromatischen Ring eine NO_2-, NO- oder NH_2-Gruppe enthalten müssen (s. Abb.4 u.5):

a) Sehr intensiv findet sich eine Verbindung mit dem Rf-Wert = 0,73, die durch Vergleichschromatogramme als Chloramphenicol identifiziert wurde.

b) Regelmäßig findet sich unter UV-Licht eine Verbindung mit dem Rf-Wert von 0,58, deren Konstitution durch colorimetrische Methoden teilweise dargestellt werden konnte.

Dieser Metabolit enthält eine aromatische Aminogruppe;

die Dichlorogruppe befindet sich nicht mehr im Molekül.

c) Regelmäßig findet man bei einem Rf-Wert = 0,27 eine Verbindung, die in äußerst schwacher Konzentration vorliegen muß, da sie unter UV-Licht nur einen schwachen Absorptionsfleck erkennen läßt. Durch colorimetrische Methoden läßt sich beweisen, daß das Molekül eine aromatische Nitrosogruppe enthält. Auch bei dieser Verbindung ist die Dichlorogruppe, vermutlich auch die Dichloracetessigsäure, abgespalten.

Zur Strukturaufklärung funktioneller Molekülgruppen wurden die getrennten Verbindungen b und c nach $B6_{b,c,f}$ behandelt:

Beide Chloramphenicolmetabolite wurden nach Reduktion und Diazotierung karminrot dargestellt.

Verbindung b färbte sich bei Diazotierung ohne vorangehende Reduktion intensiv violett. Da aber nur aromatische Amine bei Behandlung mit Butylnitrit und Kupplungsreagenz einen Azofarbstoff bilden, muß hier eine aromatische Aminoverbindung vorliegen.

Beim Acetylierungsversuch wurde diese NH_2-Gruppe mit einem Acetylrest besetzt und so dem weiteren colorimetrischen Nachweis entzogen.

Verbindung c, die sich nach Reduktion als Azofarbstoff darstellen ließ, zeigte jedoch bei alleiniger Diazotierung ohne vorherige Reduktion keine Färbung.

Bei Besprühen mit Fearrons Reagenz färbte sich dieser Chloramphenicolmetabolit goldgelb.

Er muß also am aromatischen Ring ein N-Atom enthalten, das jedoch nicht in NO_2- oder NH_2-Gruppen gebunden sein kann. Nach SMITH und WORREL (Lit.4,8), GLAZKO, DILL, WOLF und REBSTOCK (Lit.3,5,6) reduziert der Organismus die aromatische NO_2-Gruppe des Chloramphenicols über die entsprechenden Nitroso- und Hydroxylamingruppen. Eine dieser beiden Gruppen mußte hier vorliegen. Die Hydroxylamingruppe ist jedoch äußerst labil, so daß praktisch nur eine Nitrosogruppe im Molekül vorliegen kann. Um ein sehr labiles Hydroxylamin mit letzter Sicherheit auszuschließen und unsere Vermutung weiter zu stützen, acetylierten wir das Essigesterkonzentrat eines Inkubationsversuches nach B9 und

behandelten nach dünnschichtchromatographischer Trennung die Platte erneut mit Fearrons Reagenz. Dabei fanden wir den Fleck c unverändert wieder (Rf-Wert = 0,27), ebenso blieb die goldgelbe Färbung bei Besprühen mit Fearrons Reagenz.

Der sehr empfindliche Chloridnachweis mit Ammoniumperoxodisulfat und Silbernitrat ergab, daß die Metabolite b und c kein Chlorid mehr enthalten, da in wiederholten Versuchen keine Intensitätsänderung der eben angedeuteten Opaleszenz zwischen gleichen Mengen Kieselgel als Nullwert und dem Eluat der Verbindungen b und c sich zeigte. Dagegen zeigten sowohl der Chloramphenicolauszug Rf-Wert = 0,73 als auch 1000 Chloramphenicol als Vergleichswert massive kristalline AgCl-Niederschläge.

7. Vergleich der Rf-Werte der im Rattenharn (C1) und der durch Inkubation unter O_2-Begasung (C6b) gefundenen Verbindungen

Um zu sehen, ob die Chloramphenicolabbauprodukte, die mit O_2-begaster Inkubation gewonnen wurden, mit den im Rattenharn gefundenen Verbindungen identisch sind, entwickelten wir sie auf einer Platte nebeneinander. Dabei ergab sich, daß die Flecken

Chloramphenicol-Leber (O_2)		Chloramphenicol-Rattenharn
a	Rf = 0,73	a
b	Rf = 0,36	c

in ihren Rf-Werten übereinstimmten.

Fleck b des Essigesterauszuges und die colorimetrisch färbbare Schwanzbildung aus Rattenharn konnten bei den Inkubationsversuchen mit Leberschnitten nicht wiedergefunden werden, mußten also andere Chloramphenicolmetabolite darstellen.

Immerhin konnten wir zeigen, daß Chloramphenicol in der Leber enzymatisch abgebaut wird und daß die dabei entstehenden Metabolite zum Teil unverändert mit dem Harn ausgeschieden werden.

8. Vergleich der durch Inkubation bei O_2- und N_2-Begasung gefundenen Chloramphenicolabbauprodukte

WESTFALL (Lit.20), HONDA und OTSUKA (Lit.9,15) fanden eine Reduktion aromatischer Nitrogruppen unter anaeroben Versuchsbedingungen bis zum aromatischen Amin.

Dabei zeigte sich, daß gewaschene Mikrosomen anaerob nur bei Zusatz von NADPH Nitrophenylgruppen reduzierten.

In unseren Inkubationsversuchen mit Chloramphenicol konnten wir ein entsprechendes Ergebnis erzielen.

Die folgende Tabelle zeigt die isolierten Chloramphenicolmetabolite bei Inkubation unter O_2- und N_2-Begasung:

Chl.-Leber O_2		Chl.-Leber N_2
Chloramphenicol	Rf = 0,73	Chloramphenicol
	Rf = 0,58	zum aromatischen Amin reduzierter Chloramphenicolmetabolit (NH_2-)
Chloramphenicolmetabolit mit einer Nitrogruppe	Rf = 0,36	
Chloramphenicolmetabolit mit einer Nitrosogruppe (NO-)	Rf = 0,27	Chloramphenicolmetabolit mit einer Nitrosogruppe (NO-)

Unter anaeroben Verhältnissen also wird bei unseren Inkubationsversuchen Chloramphenicol zum aromatischen Amin reduziert und die Dichloressigsäure vermutlich hydrolytisch vom Molekül abgespalten.

Unter Begasung mit Sauerstoff dagegen verläuft die Reduktion nur bis zur Nitrosogruppe, wobei aber die Dichloressigsäure ebenfalls, vermutlich hydrolytisch, abgespalten wird.

Beide Nitrosometabolite sind identisch, da sie auf Vergleichschromatogrammen gleiche Rf-Werte haben und colorimetrisch ein gleiches Verhalten zeigen.

D. DISKUSSION

Um einen Überblick über die in der Rattenleber zu erwartenden Abbauprodukte des Chloramphenicol zu erhalten, wurden im Urin nach subcutaner Injektion die nicht gekoppelten Abbaustufen bestimmt.

Außerdem wurde ein Vergleich angestellt mit Abbauprodukten des Chloramphenicol aus dem Menschenharn.

Hierbei fanden sich neben dem Chloramphenicol selbst mindestens fünf weitere Metaboliten, die alle die Nitrophenylgruppe besaßen.

Im Hinblick auf die Fragestellung wurden keine Anhaltspunkte gewonnen, daß an der Nitrogruppe reduzierte Metaboliten ausgeschieden werden.

Sehr viel aufschlußreicher verliefen die Versuche an isolierten Leberschnitten, die unter verschiedenen Milieubedingungen mit Chloramphenicol inkubiert wurden:

Bei Inkubation in Sauerstoffatmosphäre fanden sich bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung in dem von uns verwendeten System Chloroform 60 / iso-Butanol 20 / iso-Propanol 20 / Methanol 2,0 außer Chloramphenicol selbst und einem an der Basis sitzengebliebenen Rest zwei eindeutige Flecken mit einem geringeren Rf-Wert als Chloramphenicol:

Der eine Fleck mit einem Rf-Wert von 0,36 war erst nach Reduktion kupplungsfähig. Er war nicht acetylierbar und ergab mit Fearrons Reagenz auf Nitrosogruppen keine Färbung. Es handelte sich demnach um einen NO_2-haltigen Metaboliten.

Die zweite Substanz mit dem Rf-Wert = 0,27 färbte sich mit Fearrons Reagenz, war erst nach Reduktion kupplungsfähig und war ebenfalls nicht acetylierbar. Nach diesen Ergebnissen handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um einen Metaboliten mit einer Nitrosogruppe am Phenylsubstituenten. Nach dem niedrigen Rf-Wert war bei dem verwendeten System zu erwarten, daß es sich um einen Metaboliten handelte, bei dem der Dichloressigsäurerest abgespalten war. Diese Annahme wurde dadurch bestätigt, daß in der eluierten Sub=

stanz kein Chlorid mit Ammoniumperoxodisulfat und Silber=
nitrat nachweisbar war.

Bei Inkubation in Stickstoffatmosphäre dagegen
fehlte der Metabolit Rf-Wert = 0,36,
während der die Nitrosogruppe enthaltende Chloramphenicol=
metabolit unverändert mit dem Rf-Wert = 0,27 wiedergefunden
wurde.
Dafür tauchte bei Rf-Wert = 0,58 ein neuer Metabolit auf,
der dadurch charakterisiert ist, daß er direkt kuppelbar,
nach Acetylierung aber nicht mehr kupplungsfähig ist. Dies
spricht für das Vorliegen eines bis zum Amin bzw. Anilin
reduzierten Metaboliten. Sowohl dem Rf-Wert nach wie auch
der negative Ausfall der Chloridreaktion sprechen dafür,
daß bei diesem Metaboliten der Dichloressigsäurerest abge=
spalten ist.

Die Versuche haben also gezeigt, daß die Nitrophenylgruppe des Chloramphenicols von Leberschnitten der Ratte unter aero=ben Verhältnissen zur Nitrosogruppe reduziert wird, während unter anaeroben Bedingungen neben dieser Stufe auch das Amin gebildet wird. Bei beiden Metaboliten ist die Dichloressig=säure schon hydrolytisch abgespalten. Damit ist allerdings noch nicht entschieden, welche Reaktion zuerst erfolgt, die Hydrolyse oder die Reduktion. Wichtig erscheint, daß es sich um nicht gekuppelte und damit biochemisch noch wirksame Meta=boliten handelt.

Es ist deshalb die Möglichkeit zu diskutieren, ob bei der Reduktion der Nitrophenylgruppen nicht im Nitrosometaboliten eine Substanz vorliegt, welche mit einer der eisenhaltigen Substanzen der mikrosomalen Reaktionskette in Beziehung tritt. Diese Reaktion könnte die blockierende Wirkung des Chloram=phenicols auf mikrosomale Umbaureaktionen in der Leberzelle erklären.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Im Menschen- und Rattenharn sowie in Schnitten von Rattenleber wurden nicht gekuppelte Metaboliten des Chloramphenicols nachgewiesen.

2. Im Harn fanden sich außer Chloramphenicol selbst fünf nitrophenylsubstituierte Metaboliten, die von uns nicht näher identifiziert wurden.

3. An Leberschnitten wurde sowohl unter aeroben wie anaeroben Bedingungen das Auftreten eines Metaboliten wahrscheinlich gemacht, bei dem es sich um ein Nitrosophenylderivat des Chloramphenicols ohne Dichloressigsäurerest handelt.

4. Es wird vermutet, daß diese Reduktionsprodukte in Zusammenhang mit der Hemmung mikrosomaler Umbauvorgänge der Leber durch Chloramphenicol stehen.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1) Wolf,L.M., Glazko,A.J., Dill,W.A., Bratton,A.C.:
"Biochemical Studies on Chloramphenicol."
J. Pharmak. exp. Therap. 96, 445 (1949)

2) Dill,W.A., Glazko,A.J.:
"Identification of Chloramphenicol Degradation Products by Paper Chromatography."
Federation Proc. 8, 34 (1949)

3) Glazko,A.J., Dill,W.A., Wolf,L.M.:
"A Colorimetric Method for the Determination of Chloramphenicol; Application to Biological Studies."
J. of Clin. Invest. 28, 1051 (1949)

4) Smith,G.N., Worrel,C.S.:
"The Application of Paper-partition Chromatography to the Analysis of Chloramphenicol and its Decomposition Products."
Arch. Biochem. 28, 1 (1950); 28, 232 (1950)

5) Glazko,A.J., Dill,W.A., Rebstock,M.C.:
"Isolation and Identification of Metabolic Products in Urine. Biochemical Studies on Chloramphenicol."
J. Biolog. Chem. 183, 679 (1950)

6) Glazko,A.J., Dill,W.A., Wolf,L.M.:
"Observation on the Metabolic Disposition of Chloramphenicol in the Rat."
J. Pharmakol. exp. Therap. 104, 452 (1952)

7) Reber,H., Lichterberg,E.:
"Papierchromatographischer Nachweis von Chloramphenicol und seinen Abbauprodukten im Urin."
Helvetia medica Acta 20, 396 (1953)

8) Smith,G.N., Worrel,C.S.:
"Reducing of Chloramphenicol and Related Compounds by E. coli."
J. Bacteriol. 65, 313 (1953)

9) Honda,K., Otsuka,S., Shimoda,Y.:
"Nitroreductase of Mammals Nitro-reducing Capacity of the Liver and its Relation to the Dehydrogenase System."
J. Biochem. (Japan) 43, 387 (1956)

10)Haan,J., Kiese,M., Werner,A.:
"Reduktion von Nitrobenzol zu Anilin in roten Blutkörperchen."
Arch. exp. Pharmak. Path. 235, 356 (1959)

11) Kiese,M.: "Bestimmung von Nitrosobenzol im Blute."
Arch. exp. Pharmak. Path. 235, 351 (1959)

12) Kiese,M.: "Oxydation von Anilin zu Nitrosobenzol im Hunde."
Arch. exp. Pharmak. Path. 235, 354 (1959)

13) Holzer,M., Kiese,M.:
"Bildung von Nitrosobenzol, Anilin und Hämiglo=
bin in Katzen und Hunden nach intravenöser
Injektion von N-Alkylanilinen."
Arch. exp. Pharmak. Path. 238, 546 (1960)

14) Bredschneider, Stur, Zweymüller:
"Schwere Chloramphenicolnebenwirkungen bei
Neugeborenen."
Dtsch. med. Wschr. 33, 1444 (1960)

15) Otsuka,S.:"Studies of Nitro-Reducing Enzymes in Swine-
Liver."
J. Biochem. (Tokio) 50, 87 (1961)

16) Spröggel,E.:
"Über die gegenseitige Beeinflußbarkeit der
Entgiftung bei Arzneimittelkombinationen."
Inauguraldissertation (1962)

17) Uehleke,H.:"Nitrosobenzol und Phenylhydroxylamin als Zwi=
schenstoffe der biologischen Reduktion von
Nitrobenzol."
Naturwissenschaften 50, 335 (1963)

18) Krug,A.: "Beeinflussung des Hexobarbitalabbaues durch
Chloramphenicol bei der Ratte."
Arch. exp. Pharmak. Path. 246, Heft 1, 58 (1965)

19) Uehleke,H.:"Biologische Oxydation und Reduktion am Stick=
stoff aromatischer Amino- und Nitroderivate
und ihre Folgen für den Organismus."
Fortschr.d.Arzeneimittelforsch. 8, 195 (1965)

20) Westfall,B.B.:
"The Reduction of 2,4,6-Trinitrotoluene by
Animal Tissue in vitro."
J. Pharmak. exp. Therap. 78, 386 (1943)

21) Gattermann-Wieland:
"Nachweis von Säurechloriden."
Praxis des organischen Chemikers 114

22) Stahl,E.: "Dünnschichtchromatographie." (1962)

23) Feigl,F.: "Spot Tests.
2, 121 (1956)

24) Warburg,O."Stoffwechsel der Tumoren."
Springer Verlag Berlin (1928)

25) Schneider, Hogboom:
"Methoden der Zellfraktionierung."

ERPROBTE FLIESSMITTEL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
NH_3													3 Tropfen			
Pril												3 Tropfen				
Phenol																
Eisessig											3 Tropfen					
n-Butanol H_2O-gesättigt																
n-Butanol																
iso-Butanol																
H_2O																
Pyridin																
Methanol	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	100	100	100			
iso-Propanol																
Aceton																
Essigester														100	50	10
Diäthyläther																
Chloroform	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Benzol																

	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
NH_3					2%			2%		2%				
Pril									3 Tropfen					
Phenol						2%								
Eisessig							2%				2%	2%	2%	
n-Butanol H_2O-gesättigt										100	100			
n-Butanol					100	100	100	100	100					
iso-Butanol					40	60	40	60	40					
H_2O														
Pyridin														
Methanol		100	100	100										
iso-Propanol					60	40	60	40	40					
Aceton												50	100	
Essigester	5	15	10	2										
Diäthyläther														
Chloroform	100				100	100	100	100	100	100	100	100	100	50
Benzol														

	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44
NH_3			2%											
Pril														
Phenol				2%										2
Eisessig		2%												
n-Butanol H_2O-gesättigt	50													
n-Butanol		50	50		20	80	80	10						
iso-Butanol									40	20	20	20	20	20
H_2O								2						
Pyridin														
Methanol				100	30	5			2,0	2,0	5	1,5	0,5	2,0
iso-Propanol									20	20	20	20	20	20
Aceton								10						
Essigester							10							
Diäthyläther				100	50	20	10							
Chloroform	50	50	50						60	60	60	60	60	60
Benzol								100						

Abb. 1

Chromatographischer Nachweis von Chloramphenicolabbauprodukten aus Ratten- und Menschenharn sowie nach Inkubation mit Schnitten von Rattenleber unter O_2-Begasung

Laufmittel: Chloroform/iso-Butanol/iso-Propanol/Methanol (60 + 20 + 20 + 2,0)

Detektion : $TiCl_3/Br_2$/Butylnitrit/N-Naphthylacetylendiamin

Laufzeit : 30 min

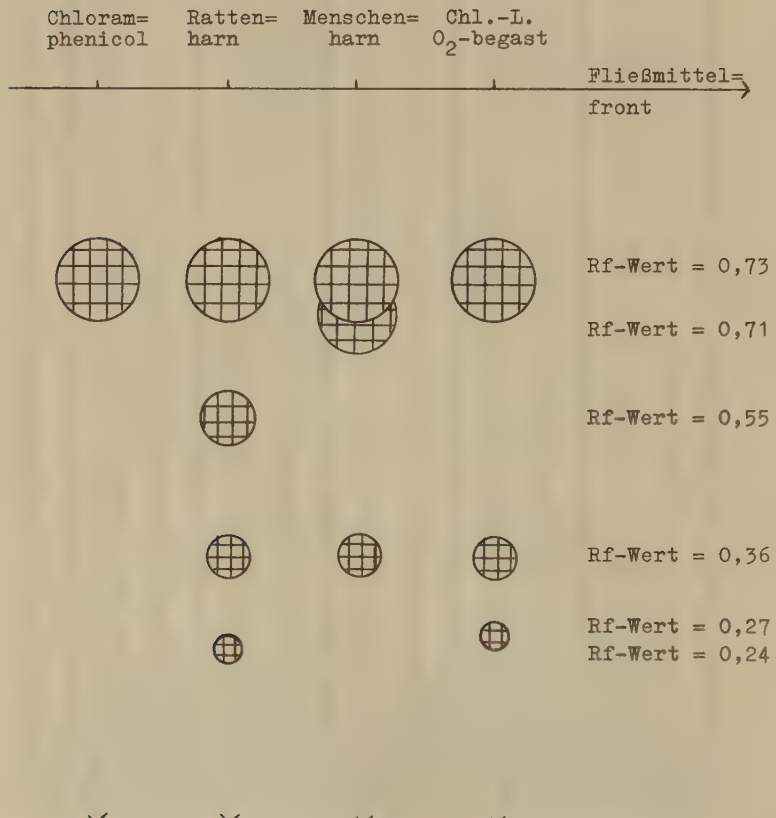


Abb. 2

Rechromatogramm der einzelnen durch die Säulenchromatographie getrennten und im Fraktionssammler gesammelten Portionen (jeweils 5 ml) Essigesterkonzentrates von 4 l Menschenharn nach 3-tägiger Chloramphenicolgabe

Laufmittel: Chloroform/iso-Butanol/iso-Propanol/Methanol
(60 + 20 + 20 + 2,0)

Detektion : $TiCl_3/Br_2$/Butylnitrit/N-Naphthylacetylendiamin

Laufzeit : 30 min

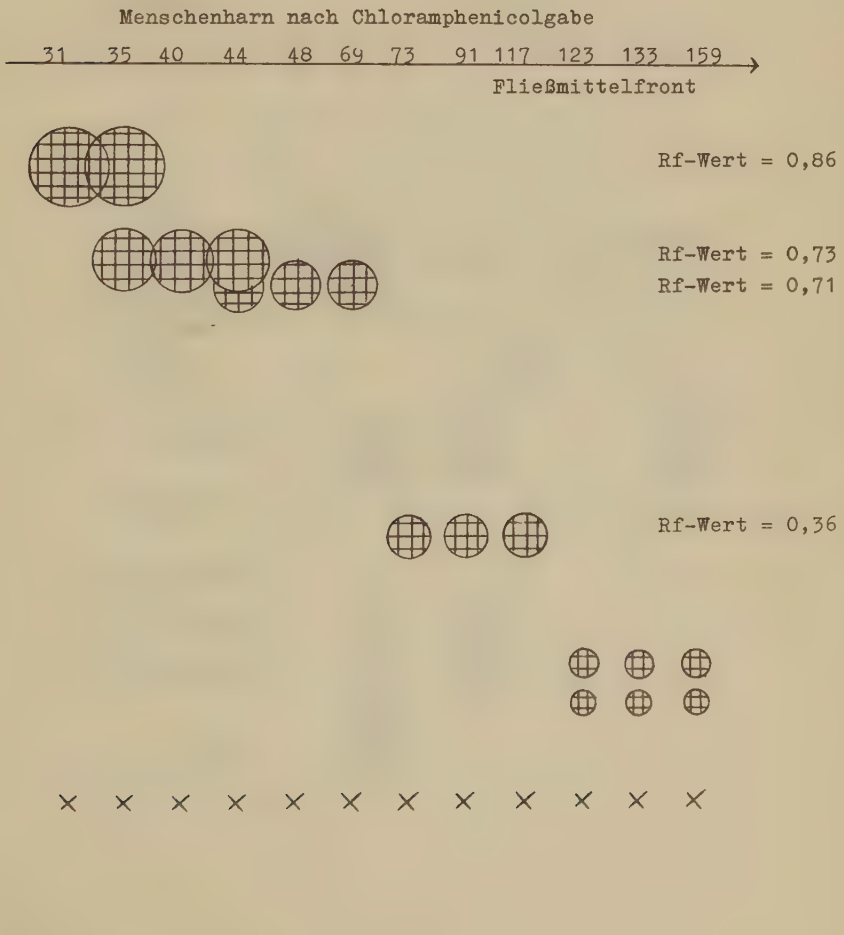


Abb. 3

Chromatographischer Nachweis von Chloramphenicolabbauprodukten nach Inkubation mit Schnitten von Rattenleber unter O_2-Begasung und nach Mikrosomeninkubation

Laufmittel: Chloroform/iso-Butanol/iso-Propanol/Methanol (60 + 20 + 20 + 2,0)

Detektion : $TiCl_3/Br_2$/Butylnitrit/N-Naphthylacetylendiamin

Laufzeit : 30 min

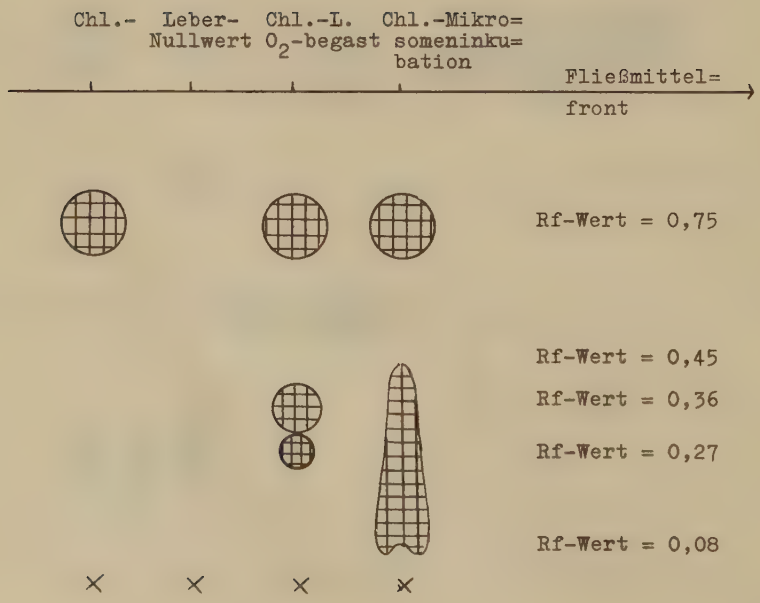


Abb. 4

Chromatographischer Nachweis von Chloramphenicolabbauprodukten nach Inkubation mit Schnitten von Rattenleber unter O_2-Begasung und unter N_2-Begasung

Laufmittel: Chloroform/iso-Butanol/iso-Propanol/Methanol
(60 + 20 + 20 + 2,0)

Detektion : I. $TiCl_3/Br_2$/Butylnitrit/N-Naphthylacetylendiamin
II. Fearrons Reagenz

Laufzeit : 30 min

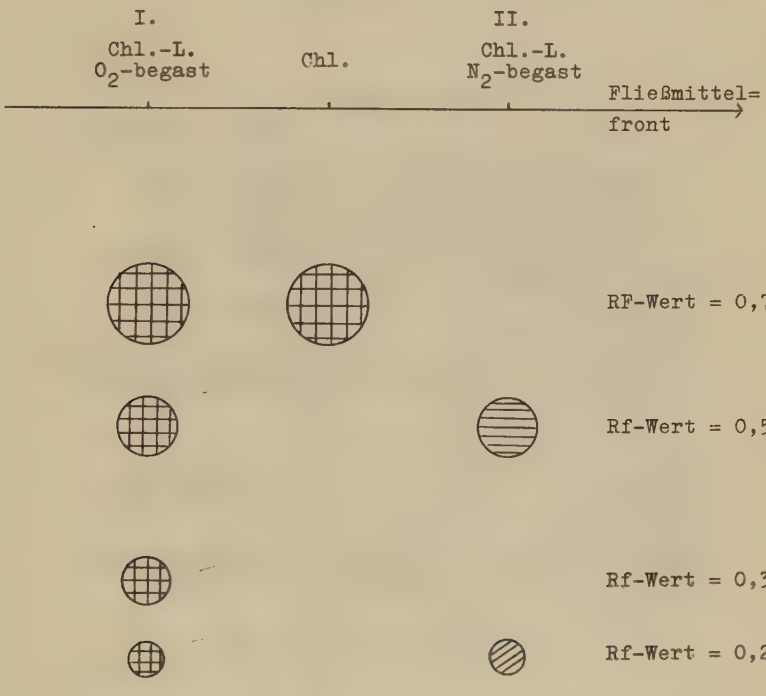


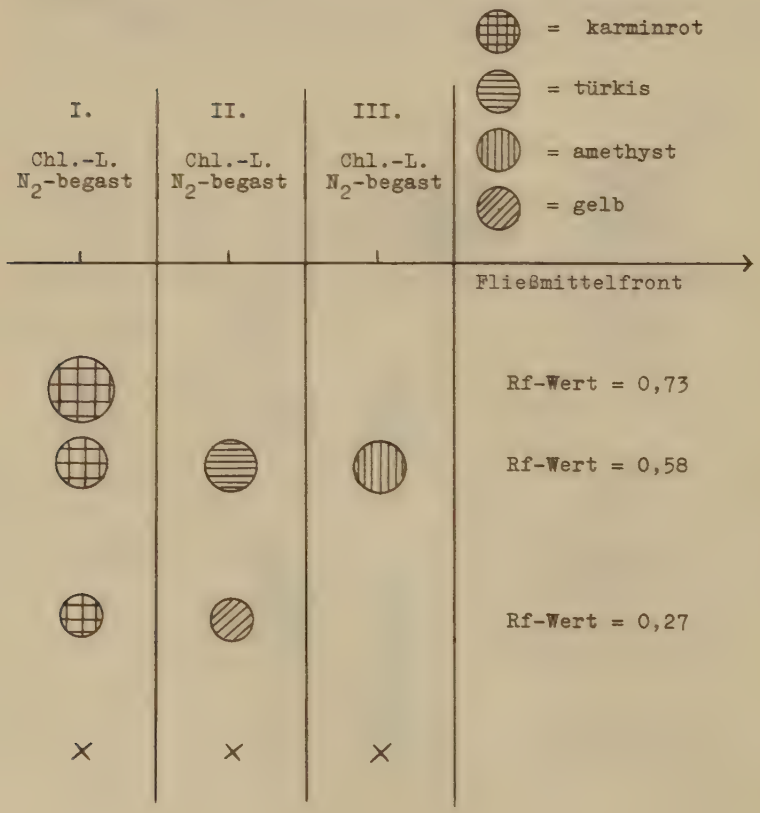
Abb. 5

Chromatographischer Nachweis von Chloramphenicolabbauprodukten nach Inkubation mit Schnitten von Rattenleber unter N_2-Begasung

Laufmittel: Chloroform/iso-Butanol/iso-Propanol/Methanol (60 + 20 + 20 + 2,0)

Detektion : I. $TiCl_3/Br_2$/Butylnitrit/N-Naphthylacetylendiamin
II. Fearrons Reagenz
III. Butylnitrit/N-Naphthylacetylendiamin

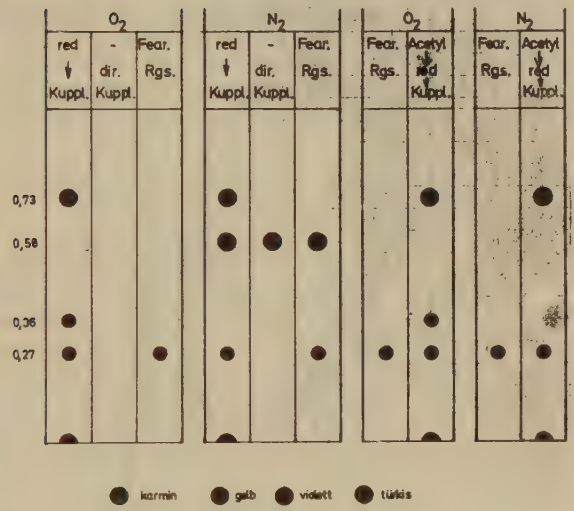
Laufzeit : 30 min

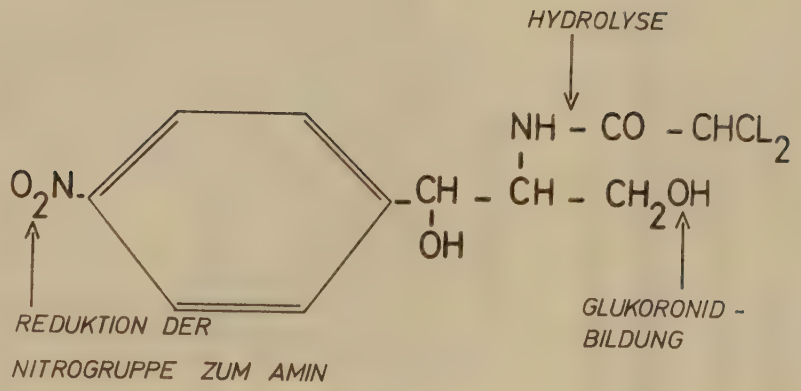


LEBERSCHNITTE (RATTE) incubiert m. Chloramphenicol

DC: Chlorof. - *iso*-Prop. - *iso*-But. - Meth.- anol
60 20 20 2

INCUBATIONS - ATMOSPHÄRE




HYDROLYSE
NH - CO - CHCL2
O2N-
-CH - CH - CH2OH
OH
REDUKTION DER
NITROGRUPPE ZUM AMIN
GLUKORONID -
BILDUNG

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Walter Schmid, möchte ich für die Anregungen und die freundliche Hilfe und Anleitung bei der Arbeit danken.

Lebenslauf

Ich, Rolf Peter Siebold, wurde am 12. Oktober 1937 als zweiter Sohn des Arztes Dr.med. Matthias Siebold und seiner Ehefrau Eleonore, geb. von Ditfurth, in Ziegenhain Kreis Ziegenhain geboren.
Vom Herbst 1944 bis Ostern 1949 besuchte ich in Ziegenhain die Volksschule und anschließend zwei Jahre lang das Realgymnasium in Treysa. Von Ostern 1951 bis 27.2.1958 war ich Schüler im neusprachlichen Zweig der Melanchthon-Schule im Steinatal, wo ich die Reifeprüfung bestand.
Nach Ableistung meiner verlängerten Grundwehrpflicht begann ich im Winteresemester 1959/60 mit dem Studium der Medizin an der Münchener Universität. Im anschließenden zweiten Semester stu= dierte ich an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg, wo ich nach dem Sommersemester 1960 den ersten Teil der ärztli= chen Vorprüfung ablegte. Mein weiteres Studium absolvierte ich in Marburg, nach dem Wintersemester 1961/62 legte ich dort den zweiten Teil der ärztlichen Vorprüfung ab. Nach sechs klinischen Semestern bestand ich am 25.3.1966 die ärztliche Prüfung.
Am 16.2.1963 heiratete ich meine Frau Antje, geb. Oehmig, wir haben inzwischen zwei Kinder.
Die experimentellen Arbeiten für die eingereichte Dissertation wurden in der Zeit vom Sommersemester 1963 bis Ende Winterseme= ster 1963/64 und vier Monate nach Beendigung des Medizinischen Staatsexamens durchgeführt.
Ich wohne mit meiner Familie in Bad Wildungen, wo ich am dor= tigen Stadtkrankenhaus als Medizinalassistent tätig bin.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten in

Marburg: Beckmann, Berendes, Bickel, Braun-Falco, Bücher, Dorer, Eggstein, Exner, Förster, Franke, Gedigk, Gerok, Hamm, Hartmann, Hensel, Hildebrandt, Hornung, Huber, Jacob, Kunz, Lang, Linneweh, Lübbers, von Manger-König, Martini, Marx, Maurath, Neubauer, Niessing, Nieth, Oehme, Oehmig, Oschke, Overbeck, Petry, Petzoldt, Quecke, Rohen, Rosenthal, Sauer, Schlegel, Schleyer, Schmid,W., Schmidt,W., Schmitz, Schneider, Schölmerich, Schrappe, Schultheis, Schultze, Schwaiger, Siegert, Siess, Spiegelberg, Stein, Steuder, Straub, Streicher, Würterle,

München: Autrum, Bachmann, Fässler, v.Lanz, Wiberg

Würzburg: Fischer, Krause, Kulenkampff, Neubert, Roedig, Simonis.